

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 024**

51 Int. Cl.:

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2008 PCT/US2008/055904**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2008 WO08109668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2008 E 08731431 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2115116**

54 Título: **Métodos para controlar el movimiento celular en biorreactores de fibra hueca**

30 Prioridad:

05.03.2007 US 892903 P

05.03.2007 US 892962 P

05.03.2007 US 892981 P

12.04.2007 US 911393 P

11.09.2007 US 971511 P

11.09.2007 US 971494 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.04.2018

73 Titular/es:

TERUMO BCT, INC. (100.0%)

10811 West Collins Avenue

Lakewood, CO 80215, US

72 Inventor/es:

ANTWILER, GLEN, DELBERT

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 665 024 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para controlar el movimiento celular en biorreactores de fibra hueca

5 ANTECEDENTES

Las células madre humanas, que se han expandido en cultivo a partir de una pequeña cantidad de células de donante, se pueden usar para reparar o reemplazar tejidos dañados o defectuosos y tienen amplias aplicaciones clínicas para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Los recientes avances en el área de la medicina regenerativa demuestran que las células madre tienen propiedades únicas, tales como la capacidad de autorrenovación, la capacidad de mantener el estado no especializado, y la capacidad de diferenciarse en células especializadas bajo condiciones particulares.

Como un componente importante de la medicina regenerativa, el biorreactor o el sistema de expansión celular desempeña un papel en la provisión de entornos optimizados para el crecimiento y la expansión celular. El biorreactor proporciona nutrientes a las células y la eliminación de metabolitos, además de proporcionar un entorno fisicoquímico propicio para el crecimiento celular en un sistema estéril cerrado. Los sistemas de expansión celular se pueden usar para cultivar otros tipos de células, así como células madre.

El documento US 6.001.585 describe un biorreactor que incluye un tubo permeable al oxígeno que contiene un haz de fibras huecas.

El documento WO 95/04813 describe un biorreactor de fibra hueca conectado a un oxigenador.

El documento US 4.885.087 describe un biorreactor con válvulas para cambiar la dirección del flujo.

Muchos tipos de biorreactores están actualmente disponibles. Dos de los más comunes incluyen biorreactores de placa plana y biorreactores de fibra hueca. Los biorreactores de placa plana permiten que las células crezcan en grandes superficies planas, mientras que los biorreactores de fibra hueca permiten que las células crezcan dentro o fuera de las fibras huecas.

Si se usan biorreactores de fibra hueca, es deseable cargar células en las fibras huecas de tal manera que las células se distribuyan adecuadamente por toda la longitud y el ancho de las fibras huecas, no solo en un extremo. Es a tales aspectos a los que se dirige la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 es una vista esquemática de un biorreactor útil en esta invención.

La FIG. 2 es un diagrama de flujo de un sistema de expansión celular que puede usarse con la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se define en las reivindicaciones.

Esta invención se refiere a un método para mover células en un biorreactor de fibra hueca donde las fibras huecas tienen un espacio intracapilar y un espacio extracapilar. El método incluye las etapas de cargar células en el espacio intracapilar y hacer fluir un fluido hacia uno del espacio intracapilar o el espacio extracapilar a una presión de caudal para mover y distribuir las células a lo largo de las fibras.

Esta descripción también se refiere a un método para resembrar células contenidas en un biorreactor de fibra hueca donde las fibras huecas tienen un espacio intracapilar. Este método incluye las etapas de hacer fluir un fluido en el espacio intracapilar a una presión de caudal para alejar las células de las paredes de las fibras huecas; mover las células fuera del biorreactor; y devolver las células eliminadas al biorreactor a resembrar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se ha analizado anteriormente, existen varias configuraciones de biorreactores para cultivar células, y debe observarse que esta invención solamente requiere que el biorreactor esté equipado con un espacio intracapilar y un espacio extracapilar.

Sin embargo, como un solo ejemplo, que no pretende ser limitante, se muestra el biorreactor de fibra hueca de la FIG. 1. Un módulo de expansión celular o biorreactor **10** que se puede usar en la presente invención, está hecho de un haz de membranas de fibra hueca **12** encerradas dentro de un alojamiento **14**. El alojamiento o módulo **14** puede ser de forma cilíndrica y puede estar hecho de cualquier tipo de material polimérico biocompatible. Las fibras huecas se denominan colectivamente como membrana. El espacio o lumen dentro de las fibras huecas se define como el espacio intracapilar (espacio IC), y el espacio que rodea el exterior de las fibras huecas se define como el espacio extracapilar (espacio EC). Como se describe, las células se cultivan y se distribuyen en el espacio IC. Como alternativa, las células pueden cultivarse en el espacio EC y pueden aplicarse los mismos principios.

10 Cada extremo del módulo **14** está cerrado con tapas terminales o cabezales **16, 18**. Las tapas terminales **16, 18** pueden estar fabricadas de cualquier material adecuado tal como policarbonato, siempre que el material sea biocompatible con las células que se van a cultivar en el biorreactor.

Se pueden mantener en su lugar aproximadamente 9000 fibras **12** de aproximadamente 295 mm de longitud dentro del alojamiento **14** con encapsulamiento de polietileno (no mostrado). Las fibras **12** y el encapsulamiento se pueden cortar en cada extremo para permitir que el fluido fluya dentro y fuera del espacio IC. Se entiende, sin embargo, que la membrana y la longitud de las fibras se pueden variar ya que esto es solamente ejemplar.

Puede haber al menos cuatro puertos dentro y fuera del módulo. Dos puertos se conectan de forma fluida al espacio extracapilar, un puerto **34**, por ejemplo, para la salida de los medios extracapilares hasta el espacio que rodea las fibras huecas, y un puerto **44** para la salida de los medios extracapilares del módulo. Dos puertos también se conectan de manera fluida al espacio intracapilar, un puerto **26** para la salida de los medios intracapilares hasta los lúmenes de las fibras huecas, así como la salida de las células a expandir, y un puerto **42** para salida de los medios intracapilares y para las células expandidas a recircular o extraer del biorreactor. Los puertos que se muestran se pueden denominar puertos de entrada o de salida o de extracción. Se entiende que los fluidos también podrían fluir en direcciones opuestas a las descritas.

Las células a expandir en el biorreactor se pueden hacer fluir en el espacio intracapilar o IC de las fibras en el ejemplo descrito. Las fibras se pueden cargar con células usando una jeringa o las células se pueden distribuir en los espacios intracapilares directamente desde un recipiente que contiene las células. Las células se pueden añadir a las fibras en el fluido utilizado para ultrafiltración o medios como se describe a continuación. Las células también se pueden introducir en el módulo de crecimiento o biorreactor desde una bolsa de entrada de células (**30**, véase la FIG. 2), que puede estar acoplada estéril directamente al espacio IC del biorreactor.

El espacio entre las fibras (espacio EC) puede usarse como un depósito de medio para suministrar nutrientes a las células y eliminar los subproductos del metabolismo celular. Si las células se cultivan en el espacio de EC, el espacio de IC se puede usar como el depósito de medio para suministrar nutrientes y eliminar los subproductos del metabolismo celular. Este medio puede reemplazarse según sea necesario. Los medios también se pueden hacer circular a través de un oxigenador **4** (véase la FIG. 2) para intercambiar gases según sea necesario. También se pueden proporcionar medios de crecimiento en el espacio de fibra hueca con las células.

Las fibras huecas pueden estar fabricadas de un material polimérico biocompatible semipermeable. Uno de dichos materiales poliméricos que se puede usar es una mezcla de poliamida, poliarietersulfona y polivinilpirrolidona. La membrana semipermeable permite la transferencia de nutrientes, desechos y gases a través de los poros de la membrana entre los espacios EC e IC. Las características de transferencia molecular de las membranas de fibra hueca se eligen para minimizar la pérdida de reactivos costosos necesarios para el crecimiento celular tales como factores de crecimiento, citocinas, etc. desde el lado IC o el lado celular, mientras se permite que los productos de desecho metabólicos se difundan a través de la membrana en el EC o el lado acelular a eliminar.

En un biorreactor, una membrana semipermeable, tal como el material descrito anteriormente, se puede usar para mover moléculas entre los compartimentos IC y EC por difusión o convección.

La difusión se logra estableciendo un gradiente de concentración a través de la membrana semipermeable. Las moléculas se difunden desde el lado de alta concentración al lado de baja concentración con una velocidad que depende de la diferencia de concentración y la permeabilidad de la membrana.

La convección molecular se produce cuando se impone un flujo de fluido a través de la membrana y va acompañado de una caída de presión correspondiente a través de la membrana. Este flujo de fluido o flujo de ultrafiltrado (UF) transporta a través de la membrana, cualquier producto o medio de desecho, excepto aquellos que no pueden atravesar la membrana debido a restricciones de tamaño de poro de la membrana o cargas superficiales de los

productos o la membrana.

La ultrafiltración o flujo de fluido a través de la membrana también se puede usar para facilitar el movimiento y la redistribución de las células dentro de las fibras.

5

Las diferencias de presión causadas por el flujo de fluido entre el interior de la membrana (lado IC) y el exterior de la membrana (lado EC) se denomina presión transmembrana (en lo sucesivo en el presente documento denominada TMP). Si la presión en el interior de la fibra hueca excede la presión en el área que rodea las fibras, este diferencial presión tiende a forzar el fluido hacia fuera a través de la pared de la membrana de la fibra. Las paredes de membrana de fibra hueca semipermeables contienen poros de diámetro extremadamente pequeño. Estos poros pueden ser demasiado pequeños para que los componentes más grandes, como las células, puedan atravesarlos. Por lo tanto, las células continúan fluyendo a través del interior de la fibra hueca. El agua y otros componentes, aquellos lo suficientemente pequeños como para pasar a través de los poros de la membrana, son empujados en cantidades variables a través de los poros de la membrana. Cuanto más pequeños sean los componentes, más fácil será que fluyan a través de la membrana de fibra y hasta el espacio de EC, para un diámetro de poro dado. De forma similar, una mayor presión transmembrana provoca una mayor tasa de filtración, es decir, una mayor tasa de flujo UF en el espacio EC. Cuanto más exceda la presión de flujo del fluido interior de la fibra hueca la presión de flujo del fluido de la cámara exterior, mayor es la fuerza ejercida para empujar los componentes a través de la membrana hacia el espacio EC.

20

El acelerar la bomba y aumentar el flujo o el caudal a través de las fibras huecas elevará la presión interior de la fibra y, por lo tanto, la presión transmembrana.

Estos principios de flujo pueden utilizarse para distribuir células a lo largo de las fibras huecas, o para ayudar a sacar las células de las superficies de las fibras huecas con el fin de sembrar o cosechar las células expandidas.

25

Para los fines de la explicación a continuación, el flujo positivo se describe como una presión más alta en el lado IC que causa el flujo hacia el lado EC. El flujo negativo se describe como una mayor presión sobre el lado EC que causa el flujo hacia el lado IC.

30

Como solo en un ejemplo, que no pretende ser limitante, en un sistema de expansión celular que incluye el biorreactor de fibra hueca descrito anteriormente, el flujo de fluido puede regularse usando diversas bombas y/o válvulas que pueden ser parte del sistema. Un esquema de un posible sistema de expansión celular se muestra en la FIG. 2. Otros sistemas de expansión celular, que también se pueden usar con esta invención, se describen en la solicitud de patente PCT/US08/55915(WO2008/109674) presentada el 5 de marzo de 2008. Solamente se analizarán las porciones de la FIG. 2 necesarias para lograr los propósitos de esta invención.

35

Una bolsa de medio EC **16** contiene medio EC para que dicho medio fluya a través del lado EC del biorreactor **10** y pueda conectarse a través de una porción de tubería flexible (la línea de entrada EC) **28** al puerto de entrada EC **20** de un oxigenador **4**. La línea de entrada EC **28** transporta medio EC fresco al oxigenador **4** para su oxigenación. Desde el oxigenador, el medio EC fluye a la entrada EC **34** a través del biorreactor hasta la salida **44**.

40

Una bolsa de medio IC **22**, que contiene el medio IC para que dicho medio fluya a través del lado IC del biorreactor, se puede conectar a través de una porción de tubería flexible (la línea de entrada IC) **24** al puerto de entrada IC **26** del biorreactor **10**. La línea de entrada IC **24** transporta medio IC fresco al lado IC del biorreactor.

45

Una bolsa de entrada de células **30** contiene las células que se van a expandir en el biorreactor **10**. La bolsa de entrada de células **30** está conectada a la línea de entrada IC **24** que suministra células al lumen de las fibras huecas a través del puerto de entrada IC **26**.

50

Cuando las células están listas para ser cosechadas, se extraen del puerto de salida IC **42** del biorreactor **10** a través de la línea de recogida de células **31** y en una bolsa de recogida de células **32**.

El residuo del lado EC se puede lavar a través de la válvula **V9** y la línea **58** a la bolsa de desecho **60**.

55

El sistema de crecimiento celular también puede incluir una longitud de tubería que actúa como un circuito de circulación IC **36**. El medio IC sale del biorreactor **10** desde el puerto de salida IC **42** a través del circuito de tuberías **36** y vuelve al biorreactor a través del puerto de entrada IC **26**. Este circuito **36** se usa para hacer recircular el medio IC a través de las fibras huecas. También se puede utilizar para enjuagar las células de las fibras huecas y sembrar/redistribuir las a través de las fibras huecas para una mayor expansión como se describe más

60

detalladamente a continuación.

También se puede proporcionar un circuito de recirculación EC que incluye las líneas **40** y **41** y la bomba **P2** para la recirculación en el lado EC.

5

Se puede añadir un lado de tubería adicional **62** según sea necesario para permitir aplicaciones específicas tales como resemebrar/redistribuir células en el biorreactor.

Como se describe a continuación, el sistema de biorreactor puede utilizar múltiples bombas para aumentar la flexibilidad del sistema.

10

Con las células a expandir en el lado IC, el medio de nutrientes circula a través del lado EC del biorreactor. Las células consumirán ciertos componentes de nutrientes del fluido EC y liberarán los productos de desecho metabólicos en el medio EC. Es importante que el fluido nutriente sea reemplazado para asegurar un cultivo celular satisfactorio. Esto se logra mediante al menos una bomba **P3**.

15

P3 bombea el medio de reemplazo fresco de la bolsa de medio de reemplazo **16** (bolsa de medio EC) al lado EC del biorreactor. En una realización, **P3** bombea alrededor de 500 ml de medio de reemplazo al sistema a una velocidad de aproximadamente 50 ml/min. La frecuencia de reemplazo del medio depende de varios factores, tal como la cantidad de células en el biorreactor y la cantidad de productos de desecho metabólicos producidos por las células, sin embargo, el reemplazo promedio del medio puede ser cada dos días.

20

P3 puede ser definido por el usuario, es decir, el usuario puede controlar el flujo del medio de reemplazo si se desean ciertas condiciones. Por ejemplo, si se desea limpiar o enjuagar el sistema, el usuario puede elegir un caudal más alto y una mayor cantidad de medio. El reemplazo del medio EC o la administración de suplementos al medio que ya está en el biorreactor también produce tener lugar en una base continua y lenta. Por ejemplo, pueden liberarse continuamente aproximadamente 0,2 ml/min de medio fresco en el sistema. La velocidad de **P3** también se puede aumentar para generar un flujo negativo en el lado EC del biorreactor, de manera que el fluido EC atravesará la membrana desde el lado EC al lado IC.

30

La bomba **P5** se puede usar para bombear el medio IC fresco desde la bolsa de medio EC **22** y las células desde la bolsa de entrada de células **30** a las fibras huecas (espacio IC) del biorreactor. Esta bomba también se puede usar para cebar el espacio IC del biorreactor con medio IC para extraer todo el aire que pueda estar presente en las fibras antes de que las células a expandir sean sembradas dentro de las fibras. Esta bomba también se puede usar si los medios IC necesitan ser reemplazados, o si se desean medios IC frescos que contengan una proporción diferente de citocinas o factores de crecimiento. La velocidad de **P5** puede aumentarse para generar un flujo positivo en el lado IC del biorreactor en comparación con el flujo de fluido EC como se describe a continuación.

35

En una realización alternativa, se podría añadir una bomba adicional al sistema básico para recircular el medio IC y las células. Como se describe a continuación, la bomba **P4** se puede usar como una bomba intracapilar para recircular el medio IC y/o a través del biorreactor. **P4** también se puede usar para crear un índice de flujo de cizallamiento sobre las células dentro del espacio IC, lo que puede ayudar a desplegar las células de la superficie de la fibra y resemebrarlas o redistribuirlas dentro del espacio IC. **P4** también se puede usar para eliminar células del biorreactor, ya sea para volver a sembrarlas en el biorreactor para su posterior expansión o para recogerlas en una bolsa de recogida de células. **P4** puede aumentarse para crear un flujo positivo o flujo de ultrafiltrado desde el lado IC hacia el lado EC a través de la membrana.

45

La velocidad operativa de las bombas **P1-P4** y el diámetro de los tubos se seleccionan para producir un caudal a través de los tubos de entre 0-150 ml por minuto durante el funcionamiento de las bombas. **P5** puede producir un caudal entre 0-250 ml/min.

50

Ejemplo 1

Las líneas de tubería **36** y **62** se pueden usar para redistribuir y/o recircular células tanto adherentes como en suspensión en el lado IC.

55

Con cultivos tanto adherentes como en suspensión creciendo en un biorreactor (específicamente un biorreactor de fibra hueca), hay ocasiones en las que es deseable redistribuir las células en crecimiento a lo largo de las fibras en el biorreactor. Si se cultivan células no adherentes, también puede ser deseable recircular continuamente las células a través del tubo y el biorreactor. Si se cultivan células adherentes, primero deben liberarse de la membrana

60

utilizando técnicas comunes tales como velocidad de cizallamiento, flujo negativo (descrito a continuación), cambio en la concentración de calcio, tripsina y/u otros métodos químicos o físicos, incluido el frío o el calor.

En este procedimiento, se proporciona una línea de recirculación (véase, por ejemplo, el circuito de tuberías **36** en la FIG. 2). Esta ruta permite que las células abandonen el biorreactor **10** a través del puerto de salida **42** y, bajo la acción de bombeo de **P4**, las células vuelven a entrar entonces en la línea de entrada IC **24** en una posición "A" cerca del puerto de entrada **26**. También puede haber una fuente de medio **22** para retrolavar las células. Desde el punto de entrada del medio fresco, las células pueden extraerse en ambas direcciones como se describe a continuación para asegurar que las células se extraigan desde la línea de recirculación **36** de vuelta al biorreactor.

Con las válvulas **v6** y **v8** cerradas, la bomba **P4** se puede usar para hacer circular las células en el circuito cerrado resultante **36** a través del biorreactor **10** hasta que se logra la uniformidad deseada de la mezcla celular.

Después de que las células se mezclan eficazmente, se abre la válvula **v6** y se cierra la válvula **v8**, se activa la bomba **P5** y la bomba **P4** se ajusta para bombear a una velocidad inferior a la de la bomba **P5**. La bomba **P5** bombeará el medio IC al sistema. La bomba **P4** desviará eficazmente una porción del flujo recirculado hacia la entrada del biorreactor **26**, y el resto se forzará a la salida del biorreactor **42** mediante el flujo de medio a través de las líneas **62** y **36** y la válvula **V6**. Ambas bombas extraerán las células de manera eficaz de vuelta al biorreactor. Cualquier exceso de fluido que entre al biorreactor se forzará a través de las fibras huecas como ultrafiltrado si la presión de flujo del fluido IC es mayor que la presión de flujo del fluido EC. El ultrafiltrado también empujará las células hacia las paredes de las fibras huecas. La posición en la que la línea de retrolavado **62** se conecta a la línea de recirculación **36** (mostrada en la FIG. 2 como unión **C**) y el volumen/número de células a cada lado de esta conexión determinará cuántas células se redistribuyen a través de la salida **42**. Este punto de conexión podría colocarse tan cerca del biorreactor que eficazmente se redistribuirían todas las células por medio del puerto de entrada del biorreactor **26**, posiblemente incluso eliminando la necesidad de extraer el medio en ambas direcciones.

Lo anterior muestra cómo las células pueden distribuirse y recircularse a través del biorreactor utilizando ultrafrecuencia y retrolavado. El proceso podría ser el mismo para las células adherentes después de que tales células se liberen de la membrana añadiendo un agente de liberación química u otros métodos como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, las células podrían sembrarse en el biorreactor siendo eliminadas primero del biorreactor y de las tuberías en la bolsa de recogida de células **32**. Para sembrar las células, la bolsa de recogida **32** puede fijarse al puerto de entrada del biorreactor **26**, de la misma manera en cuanto a la carga de las células.

En otra alternativa, las células podrían eliminarse del biorreactor en la bolsa de recogida de células **32**. Todas las células que permanecen en el biorreactor podrían expandirse entonces. Este proceso podría repetirse de manera continua.

Describiendo adicionalmente la FIG. 2, un circuito de recirculación EC **40** permite recircular el medio en el lado EC del biorreactor. El circuito de recirculación EC **40** permite que el medio EC salga del biorreactor desde el puerto de salida EC **44** de regreso al biorreactor a través del puerto de entrada EC **34**. Este circuito puede usarse para recircular el medio EC que rodea las fibras huecas, aportando nutrientes de una porción del biorreactor a otra. Al mantener el flujo de fluido EC menor que el flujo de fluido IC, la presión del flujo de fluido IC será mayor que la presión del flujo de fluido EC, permitiendo que el flujo de fluido IC fluya a través de la membrana, creando un flujo de fluido positivo.

Como alternativa, si es deseable cultivar las células en el lado EC, el flujo de fluido EC puede ser mayor que el flujo de fluido en el lado IC, para forzar el fluido desde el lado EC hacia el lado IC, creando un flujo de fluido negativo. Este flujo estaría bajo la fuerza de las bombas **P3** y **P2**. Si **P3** es mayor que **P2**, puede producirse un retrolavado en la salida **44** para ayudar a sembrar el lado EC.

El medio IC y EC que contiene productos de degradación metabólica del crecimiento celular se eliminan del sistema a través de las tuberías **58** en una bolsa de desechos **60**.

Ejemplo 2

Uso de ultrafiltración positiva para facilitar la unión de MSC sustancialmente purificadas a la membrana.

Si se van a expandir células adherentes tales como células madre mesenquimales (MSC) en un biorreactor de fibra

hueca, las células deben unirse primero a la superficie de las fibras para comenzar su ciclo de crecimiento normal. Para mejorar/promover esta unión, se podría aplicar una presión positiva causada por un mayor flujo de fluido en el lado IC, es decir, la presión en el compartimento del lado de la célula (lado IC) es mayor que la presión en el lado no celular (lado EC). En el sistema de expansión celular descrito anteriormente, se podría lograr un flujo positivo aumentando la velocidad de la bomba y, por lo tanto, el flujo de fluido o presión de fluido en el lado IC. Esto se hace aumentando la velocidad de la bomba **P5** que controla el flujo del medio IC en las fibras huecas del biorreactor.

Como se ha analizado anteriormente, el flujo aumentado de fluido causará un flujo de fluido a través de las fibras, creando un flujo positivo, que ayudará a arrastrar las MSC a la pared de las fibras. Dicho flujo es ventajoso ya que este flujo arrastrará las células a todas las partes de la superficie de la fibra celular, donde, si se usara solo la gravedad para distribuir las células en el biorreactor, las células se asentarían predominantemente en el cabezal del biorreactor **16** (véase la FIG. 1) o solo a una corta distancia de las fibras, no a lo largo de toda la longitud y circunferencia de las fibras.

Se podría continuar aplicando una tasa de ultrafiltración positiva o flujo positivo (posiblemente a un nivel reducido) para mantener las MSC en la superficie de la fibra hasta que las células se unan, posiblemente durante unas pocas horas a algunos días.

Este método es más útil cuando las células a expandir se purifican sustancialmente antes de que se añadan al biorreactor. Para los propósitos de este ejemplo, sustancialmente purificado significa que un tipo de célula es predominante en comparación con otros tipos de células en una suspensión celular.

Después del período de unión, se podría usar un flujo de fluido sustancialmente nulo o un flujo de fluido ligeramente negativo a través de las fibras para hacer que cualquier célula que no se fijó a la membrana fuera eliminada del biorreactor. El flujo de fluido negativo puede producirse bajando la presión del caudal IC en comparación con la del lado EC.

Si las células no adherentes se cultivaran en un biorreactor de fibra hueca, también se podría usar flujo positivo para mantener las células contra las paredes de las fibras para evitar que las células se expulsaran del biorreactor cuando el anterior medio IC se reemplazó por medio IC fresco.

Ejemplo 3

Uso de flujo negativo o ultrafiltración inversa para crear el modo de suspensión celular.

Se podría usar un flujo de fluido negativo o ultrafiltración inversa para ayudar a mantener las células en un modo de suspensión. Por ejemplo, el flujo negativo produce un flujo de fluido desde el lado EC al lado IC. El flujo de fluido hacia las fibras alejará las células de la pared. En el sistema de expansión celular descrito anteriormente, se puede lograr un flujo negativo aumentando la velocidad de la bomba **P2** que controla el flujo de fluido EC hacia el biorreactor, cerrando la válvula **v9** y abriendo la abrazadera **c2**. Además de o como alternativa, la válvula **v7** podría abrirse, y la velocidad de la bomba **P3** aumentaría de manera que la velocidad de **P3** sea mayor o igual que la velocidad de la bomba **P2**.

Se podrían usar combinaciones de flujo positivo y negativo para cargar células en el biorreactor. El flujo negativo podría usarse para crear un modo de suspensión en la entrada del biorreactor seguido de una región en el biorreactor de flujo positivo donde la suspensión celular ya no se mantenía (es decir, un modo de adhesión). Al utilizar dichas combinaciones de flujo de fluido positivo y negativo, se podría evitar la deposición de células en una primera región del biorreactor y mejorar el depósito de células en una segunda región.

Ejemplo 4

Uso de flujo de fluido positivo y negativo para distribuir y eliminar células no adherentes de un biorreactor de fibra hueca.

Como se analizó en el Ejemplo 2, las células a expandir en un biorreactor de fibra hueca se pueden purificar primero, antes de cargarlas en el biorreactor. Sin embargo, las células no purificadas tales como la médula ósea entera también pueden cargarse directamente en un biorreactor de fibra hueca. El flujo positivo se puede usar primero para ayudar a que la porción de células adherentes de la médula ósea se adhiera a las fibras, seguido de la aplicación de flujo negativo para ayudar a extraer la porción de células no adherentes de la médula ósea entera, tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas de las fibras huecas.

- Se pueden hacer fluir 50 ml de médula ósea entera (que es la cantidad típicamente extraída directamente de un solo drenaje de médula ósea) directamente desde la bolsa de entrada de células 30 (véase la FIG. 2) a través del puerto de entrada IC **26** a las fibras huecas. El puerto de salida IC **42** se sujeta durante la carga para evitar la pérdida de células, así como para crear un flujo de fluido positivo. Una vez cargada, la médula ósea se incuba durante aproximadamente 1-4 días para permitir que las células adherentes en el tiempo de la médula ósea se adhieran a las fibras. Como alternativa, se puede aplicar ultrafiltración positiva o flujo de fluido para ayudar a arrastrar las células a la membrana para ayudar a las células a adherirse.
- 10 El flujo negativo, después de la apertura de la salida **42**, se puede aplicar entonces para empujar todas las células superfluas, que no están adheridas a la membrana, fuera del biorreactor. Esto se hace mediante el uso de **P3** para aumentar el caudal del medio EC a través del biorreactor. **P2** y **P3** crean un flujo negativo en el biorreactor para despegar las células no adherentes de las fibras y expulsarlas de las fibras, dejando solamente las células que se han adherido a las fibras en el biorreactor.

15

Ejemplo 5

Distribución selectiva en fibras huecas usando gradientes de densidad.

- 20 El espacio IC y los espacios EC del biorreactor se podrían llenar inicialmente con un medio que tenga una densidad d_1 . Las células a cultivar en el biorreactor pueden suspenderse en un medio que tenga una densidad d_2 donde $d_2 > d_1$ y luego cargarse en el espacio IC del biorreactor. El biorreactor podría mantenerse en posición horizontal, y si se usara un caudal de entrada de células lento, las células (en medios más pesados) caerán al fondo del cabezal de entrada del biorreactor y luego fluirán solamente hacia estas fibras en el fondo del biorreactor. El uso de la viscosidad (μ_1, μ_2) y el caudal también podrían ser útiles para colocar las células dentro de las fibras.

25

Ejemplo 6

Usar flujo de fluido para distribuir células mitóticas a lo largo de una fibra hueca.

30

Durante la división celular o la mitosis, las células adherentes tienden a separarse de la membrana sobre la que están adheridas, o al menos a unirse más débilmente a las mismas.

- 35 En esta realización, las células se cultivan en el lado IC de la membrana y se impone un flujo de medio a través de las fibras huecas. Este flujo de fluido a través de las fibras huecas imparte una fuerza de cizallamiento sobre las células. Esta fuerza se utiliza para ayudar a despegar las células que experimentan mitosis de la membrana y mover las células despegadas hacia abajo de la fibra hueca con la corriente del medio.

- 40 El flujo de fluido a través de la membrana debe ser lo suficientemente lento para permitir que las células despegadas caigan fuera de la corriente del medio. Una vez fuera de la corriente del medio, las células se volverán a unir a la membrana en ubicaciones más aguas abajo, facilitando así la redistribución y el crecimiento en más lugares a lo largo de la fibra.

- 45 La selección de combinaciones de bombas que tienen resultados de flujo variables también podría usarse para regular el flujo de fluido a través de las fibras. Dichas combinaciones de bombas podrían usarse para crear períodos de mayor cizallamiento para liberar las células de la membrana, seguido de períodos de cizallamiento inferior para permitir que las células se depositen y vuelvan a unirse a la membrana.

- 50 Tal método también se podría usar para cargar inicialmente las células que van a expandirse en el biorreactor en la entrada a las fibras huecas y usando el método de flujo intermitente para mover las células hacia abajo de las fibras.

Los ejemplos proporcionados anteriormente son varias de las aplicaciones que podrían utilizarse siguiendo los principios de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

55

REIVINDICACIONES

1. Un método para mover células en un biorreactor de fibra hueca (10) donde las fibras huecas (12) tienen un espacio intracapilar y un espacio extracapilar, el método comprende las etapas de:
- 5 cargar células en el espacio intracapilar o el espacio extracapilar;
hacer fluir fluido hacia uno del espacio intracapilar o el espacio extracapilar que contiene las células; y
proporcionar una presión de flujo de fluido en uno del espacio intracapilar o el espacio extracapilar mayor que la
10 presión de flujo de fluido en el otro espacio intracapilar o extracapilar.
2. El método de la reivindicación 1, donde la etapa de proporcionar una presión de flujo de fluido comprende cambiar la presión de flujo de fluido en el espacio que contiene las células en comparación con el otro del espacio intracapilar o el extracapilar.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, que comprende además aumentar la presión de flujo de fluido aumentando el volumen de fluido en el espacio que contiene las células.
4. El método de la reivindicación 1, donde las células que se van a mover están en el espacio intracapilar.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, que comprende además mover las células a la superficie de las fibras huecas.
6. El método de la reivindicación 1, donde las fibras huecas comprenden poros.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, donde la etapa de hacer fluir fluido comprende además fluir parte del fluido desde el espacio que contiene las células al otro del espacio intracapilar o el espacio extracapilar a través de los poros de la fibra hueca.
- 30 8. El método de la reivindicación 5, donde la etapa de mover las células a la superficie de las fibras huecas comprende además permitir que las células se adhieran a la superficie de las fibras huecas.
9. El método de la reivindicación 3, donde aumentar la presión de flujo de fluido comprende aumentar la velocidad de la bomba de fluido para aumentar la velocidad del flujo de fluido.
- 35 10. El método de la reivindicación 5, donde la etapa de hacer fluir fluido comprende mantener las células sobre la superficie de las fibras huecas.
11. El método de la reivindicación 1, que comprende además mantener las células en un modo de
40 suspensión dentro del espacio.
12. El método de la reivindicación 1, que comprende además mover las células alejándolas de la superficie de las fibras huecas.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, donde la etapa de mover las células alejándolas de las paredes de las fibras huecas comprende además liberar las células de las paredes de las fibras huecas.
14. El método de la reivindicación 13, donde la etapa de liberar las células de las paredes de las fibras huecas comprende además añadir un producto químico de liberación al fluido.
- 50

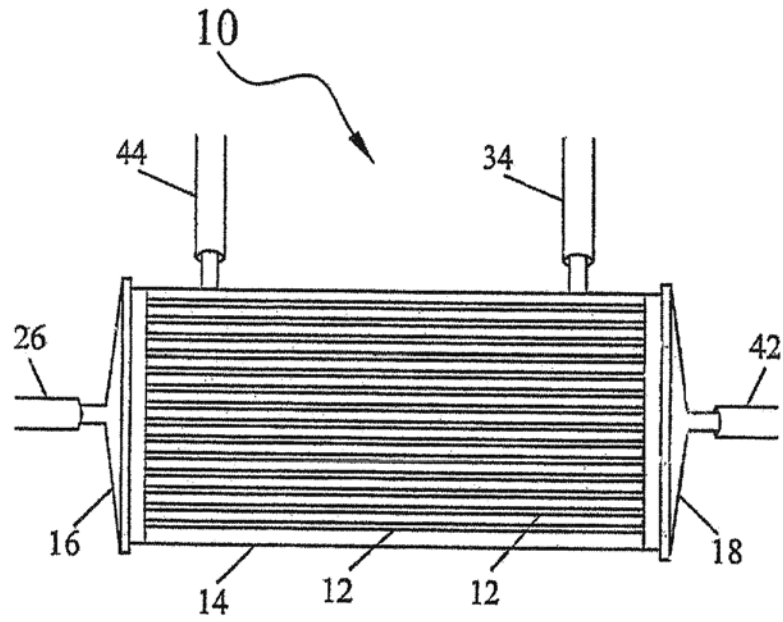


Figura 1

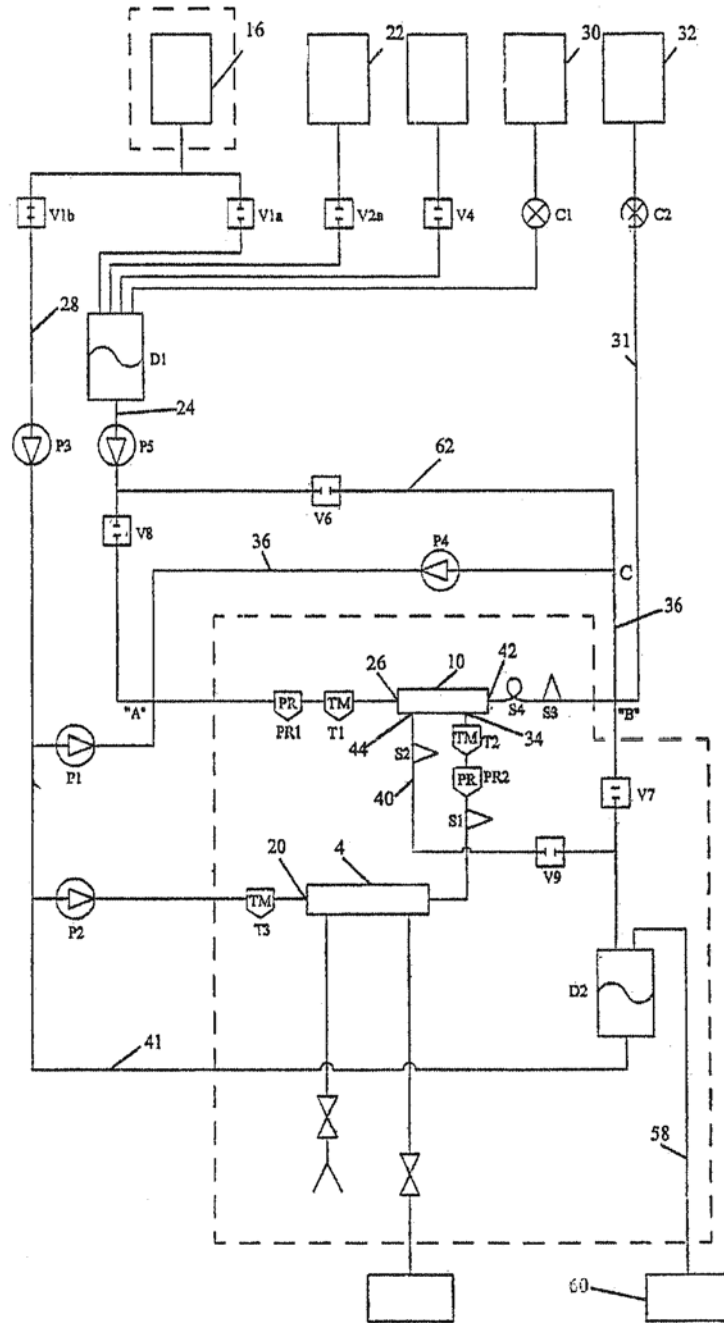


Figura 2